

На правах рукописи



Антошин Артем Анатольевич

**Биодеградируемые матрицы на основе фибриллярного коллагена для
аугментационной уретропластики**

1.1.10. Биомеханика и биоинженерия

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Работа выполнена в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)

Научный руководитель:

доктор химических наук, доцент

Тимашев Петр Сергеевич

Официальные оппоненты:

Ширманова Марина Вадимовна – кандидат биологических наук, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Приволжский исследовательский медицинский университет» Минздрава России, Научно-исследовательский институт экспериментальной онкологии и биомедицинских технологий, заместитель директора по науке

Ризванов Альберт Анатольевич – доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет», Институт фундаментальной медицины и биологии, научно-исследовательская лаборатория OpenLab «Генные и клеточные технологии», главный научный сотрудник

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий Федерального медико-биологического агентства»

Защита диссертации состоится «29» декабря 2023 г. в 10:00 часов на заседании диссертационного совета ДСУ 208.003.02 при ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119048, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2.

С диссертацией можно ознакомиться в ЦНМБ ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (119034, г. Москва, Зубовский бульвар, д.37/1) и на сайте организации: <https://www.sechenov.ru>

Автореферат разослан « _____ » _____ 2023 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
кандидат химических наук



Савватеева Людмила Владимировна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Стриктура уретры – это распространенное урологическое заболевание, выявляемость которого у мужчин колеблется от 200 до 1200 на 100 000 населения [Alwaal et al., 2014]. Лечение стриктур уретры чаще всего хирургическое, и одной из наиболее распространенных операций является аугментационная уретропластика с использованием аутооттрансплантата [Mangera, Patterson, Chapple, 2011]. В ряде случаев забор аутооттрансплантата может быть связан с осложнениями и ограничениями в донорской зоне [Atala et al., 2017], поэтому в качестве альтернативы аутооттрансплантатам для пластики уретры предпринимаются попытки использования тканеинженерных матриц [Fiala et al., 2007]. Матрица представляет собой каркас, по которому, после его имплантации, будут нарастать собственные клетки пациента.

Для уретропластики было предложено два вида матриц: небиodeградируемые и биodeградируемые. Применение матриц первого вида не увенчалось успехом по причине большого количества осложнений [Denstedt, Atala, 2009], поэтому внимание современных исследований сместилось в сторону разработки биodeградируемых матриц. Наиболее перспективными матрицами из биodeградируемых полимеров, пригодных для уретропластики, являются матрицы на основе коллагена [Pederzoli et al., 2019]. Его преимуществами является полная биосовместимость, регулируемая и прогнозируемая биodeградация, высокая адгезивная способность, приемлемые механические свойства, а также наличие обусловленных природой прорегенеративных свойств [Wang, Wang, Dong, 2023].

С целью улучшения результатов лечения стриктур уретры в сложных случаях ряд исследователей сообщал о необходимости нанесения на матрицы клеточного компонента для создания тканеинженерных конструкторов (ТИК) [Qi, Li, Tian, 2016]. Наибольший интерес вызывает создание ТИК с максимально похожей на нативную ткань структурой по причине лучшей биоинтеграции, функциональности и качества регенерации [Reddy, Reddy, 2018]. Создание подобных ТИК возможно методом биопечати [Ashammakhi et al., 2019]. В последние годы для биопечати ТИК набирает популярность использование клеточных сфероидов, имеющих ряд преимуществ перед традиционными клеточными 2D-культурами и суспензиями [Liu, Chen, Win Naing, 2021].

Степень разработанности темы

Способы получения матриц на основе коллагена для уретропластики можно разделить на две категории. Первая категория – получение матриц в результате децеллюляризации нативных тканей. Такие матрицы обладают природной биоактивностью, однако возможности стандартизации и регулировки их свойств сильно ограничены [Hoshiba et al., 2010], что может приводить к высокой вариативности успешности клинических результатов [Qi, Li, Tian, 2016].

Кроме того, в децеллюляризованных матрицах могут присутствовать остаточные антигены, которые способны вызвать воспаление и фиброз окружающих тканей уретры после имплантации [Wong, Griffiths, 2014].

Ко второй категории способов получения матриц на основе коллагена относятся различные подходы к его реконструкции [Versteegden et al., 2017], позволяющие стандартизовать итоговый продукт, минимизировать его антигенность и получить больше контроля над его финальными свойствами. Однако типичными недостатками реконструированных коллагеновых матриц являются их неудовлетворительные структурно-механические свойства, приводящие к трудностям при манипулировании хирургом и развитию дивертикулов в зоне имплантации [Nuininga et al., 2010; Pinnagoda et al., 2016]. Вследствие этого исследователями продолжается поиск оптимальных технологий реконструкции коллагена, позволяющих получить матрицы с приемлемыми для уретропластики свойствами [Pederzoli et al., 2019].

Одной из таких технологий может стать электрофоретическое осаждение (ЭФО) [Li et al., 2019]. ЭФО позволяет изготавливать коллагеновые матрицы с необходимыми размерами, структурой и химическим составом воспроизводимым и строго контролируемым способом. Однако основной проблемой ЭФО является инкорпорирование пузырей газа в структуру получаемых матриц, что формирует в них дефекты и существенно ухудшает их механические свойства [46]. В данном исследовании нами впервые была разработана уникальная технология электрофоретического осаждения с применением полупроницаемого барьера (ЭФО-ППБ), позволяющая решить проблему инкорпорирования пузырей и получить бездефектные механически прочные матрицы для уретропластики.

При этом, для создания матриц нами был использован фибриллярный коллаген, как наиболее его наиболее механически прочная форма с максимально сохранной нативной структурой [Ghodbane, Dunn, 2016]. Кроме того, за счет дополнительной постобработки матрицы приобрели Янус-структуру (в честь двуликого бога Януса), становясь более пригодными для уретропластики [Cunpane et al., 2021]. Одна их сторона была сплошной, выполняя барьерную функцию (от проникновения мочи), а другая была перфорированной, способствуя более быстрому врастанию соединительной ткани с сосудами.

В данной работе мы впервые разработали технологию биопечати жизнеспособных клеточных сфероидов на Янус-матрицу при помощи лазерно-индуцированного прямого переноса (LIFT, от англ. laser-induced forward transfer) и создали модельный тканеинженерный конструкт уретры. Модельным он назван по причине использования сфероидов из мезенхимальных стромальных клеток (МСК). МСК не являются основными клетками стенки уретры, однако они служат удобной моделью для валидации новых способов и модификаций биопечати [Bikmulina et al., 2023]. В сравнении с другими методами LIFT является одним из самых перспективных

подходов к биопечати сфероидов, однако до сих пор его потенциал для решения этой задачи реализован не был [Antoshin et al., 2023].

Цель исследования

Целью настоящей работы является создание тканеинженерного конструкта уретры на основе механически прочных коллагеновых Янус-матриц для аугментационной уретропластики.

Задачи исследования

1. Разработать технологию электрофоретического осаждения бездефектных коллагеновых матриц из фибриллярного сырья.
2. Проанализировать структурные и механические свойства коллагеновых матриц.
3. Определить биосовместимость коллагеновых матриц *in vitro* и *in vivo*.
4. Разработать способ модификации коллагеновой матрицы для получения Янус-матрицы.
5. Испытать Янус-матрицу на модели аугментационной уретропластики.
6. Разработать технологию биопечати клеточных сфероидов на Янус-матрицу для создания модельного тканеинженерного конструкта уретры.

Научная новизна

1. Впервые разработана технология электрофоретического осаждения с полупроницаемым барьером для производства механически прочных бездефектных матриц из фибриллярной суспензии коллагена.
2. Впервые из электрофоретически осажденных коллагеновых матриц получены Янус-матрицы, которые доказали свою эффективность в качестве трансплантата для аугментационной уретропластики.
3. Впервые разработана технология биопечати клеточных сфероидов при помощи лазерно-индуцированного прямого переноса с Пи-шейпером для создания модельного тканеинженерного конструкта уретры.

Теоретическая и практическая значимость работы

Разработанная методика ЭФО-ППБ продемонстрировала высокий потенциал для производства коллагеновых матриц, которые могут быть использованы в хирургии. Полученные этим способом коллагеновые матрицы могут найти широкое применение в областях урологии, травматологии и ортопедии, общей хирургии, стоматологии, офтальмологии, колопроктологии, урологии и ЛОР. Данное диссертационное исследование, в частности, имеет высокое практическое значение для развития методики уретропластики с использованием передовых технологий регенеративной медицины, использующих коллагеновые тканеинженерные матрицы в качестве трансплантатов как альтернативу традиционному методу лечения стриктур уретры с помощью буккального трансплантата.

Тканеинженерный конструкт уретры, полученный при помощи разработанного метода LIFT-биопечати, может применяться для сложных случаев уретропластики, где применение клеточных конструктов имеет больший шанс успеха. Более того, разработанный способ LIFT-биопечати универсален и открывает широкие возможности для создания других ТИК тканей и органов (кожи, печени, сердца, сосудов). Еще одной из наиболее перспективных точек приложения LIFT-биопечати сфероидами является создание органов (платформ) на чипе. Такие устройства могут быть применены как с точки зрения фундаментальной науки и изучения клеточных взаимодействий, так и практически – в фармацевтической индустрии для скрининга лекарств.

Методология и методы исследования

В ходе выполнения диссертационной работы был использован комплекс физико-химических, цитологических, гистологических и морфометрических методов исследования. Из животного сырья кислотной экстракцией была выделена фибриллярная суспензия коллагена. Охарактеризована морфология фибрилл, их электрофоретическая подвижность и молекулярный состав. Из выделенной суспензии при помощи метода ЭФО-ППБ были получены коллагеновые матрицы. Охарактеризован их химический состав, структурно-механические свойства, доказана биосовместимость *in vitro* и *in vivo*.

За счет лиофилизации и механической перфорации из коллагеновых матриц были получены Янус-матрицы, и охарактеризованы их физико-механические и структурные свойства. Янус-матрицы были имплантированы *in vivo* на модели аугментационной уретропластики. С помощью технологии LIFT-биопечати клеточных сфероидов на основе Янус-матриц был создан модельный тканеинженерный конструкт уретры, и определена жизнеспособность сфероидов после биопечати.

Личный вклад автора

Автору принадлежит ведущая роль в разработке технологии электрофоретического осаждения с полупроницаемым барьером, а также LIFT-биопечати клеточных сфероидов. Автор принимал участие в биологических экспериментах *in vitro* и имплантационных экспериментах *in vivo*; самостоятельно планировал и проводил эксперименты по физико-химической характеристике коллагеновых матриц, обрабатывал и интерпретировал результаты, представлял и апробировал результаты исследований на конференциях, подготавливал научные публикации по выполненной работе, осуществлял написание текста диссертации.

Положения, выносимые на защиту

1. Технология электрофоретического осаждения с полупроницаемым барьером позволяет производить механически прочные фибриллярные коллагеновые матрицы с высоким модулем упругости (7–64 МПа) и растяжением на разрыв (24–60 %) в зависимости от химической сшивки.

2. Произведенные коллагеновые матрицы являются биосовместимыми *in vitro* для клеток (выживаемость >70%) и *in vivo* при подкожной имплантации. На 21-й день после имплантации сшитые матрицы резорбируются в 3,5 раза медленнее несшитых и вызывают профибротический ответ.

3. Янус-матрицы, полученные из несшитых матриц, могут применяться для аугментационной уретропластики у кроликов. Янус-матрицы способствуют полной эпителизации дефекта к 45-му после операции, отсутствию рубцевания и стриктурирования на 180-й день наблюдения.

4. Биопечать при помощи лазерно-индуцированного прямого переноса позволяет наносить клеточные сфероиды на Янус-матрицы для создания модельного тканеинженерного конструкта уретры с высокой выживаемостью (95%).

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертация соответствует паспорту научной специальности 1.1.10. Биомеханика и биоинженерия, в том числе, следующим направлениям исследований согласно пунктам: 10 (создание заменителей органов и тканей); 18 (выращивание методами регенеративной медицины органов и тканей для компенсации утраченных или компенсации их пониженных физиологических функций).

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных результатов определяется репрезентативным объемом проведенных экспериментальных исследований: в физико-химических и биологических испытаниях было проанализировано не менее 5 образцов в каждой исследуемой группе; в эксперименте подкожной имплантации участвовало 20 крыс, аугментационной уретропластики – 18 кроликов, что является достаточным для получения достоверных данных. Достоверность результатов подтверждается также применением современных методов исследования, использованием сертифицированного научного оборудования и реактивов, строгим следованием общепризнанным исследовательским протоколам, статистической обработкой полученных данных с использованием современных методов количественной статистики и применением сертифицированных компьютерных программ.

Основные результаты диссертационного исследования были представлены и обсуждены на 18-ой Международной конференции «Оптика Лазеров» (2018, Санкт-Петербург), Научной конференции «Клиническая медицина и фармация – 2021» (Харбин), VI Всероссийском молодежном научном форуме «Наука будущего – наука молодых» (2021, Москва), XI Международной конференции по фотонике и информационной оптике (2022, Москва), Семинаре «Современные тренды в биофотонике 2023» (Нижний Новгород), Международном симпозиуме регенеративной медицины «Хронические и дегенеративные заболевания» (2022, Тегеран), VI

Международной конференции «Актуальные проблемы регенеративной медицины и имплантологии. 3D-принтинг и 3D-биопринтинг» (2022, Ставрополь). Также по результатам разработки технологии LIFT автор стал лауреатом премии Правительства Москвы молодым ученым за 2021 год в области разработок для биотехнологий.

Апробация диссертации состоялась на заседании Института регенеративной медицины Научно-технологического парка биомедицины ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), протокол № 8 от 21.08.2023.

Выполнение работ по диссертационному исследованию было поддержано Министерством науки и высшего образования Российской Федерации в рамках соглашения №075-15-2021-596.

Публикации по теме диссертации

По результатам исследования автором опубликовано 10 научных работ, в том числе 6 статей в международной базе данных Scopus; 1 иная публикация по теме диссертационного исследования; 3 публикации в сборниках материалов международных и всероссийских научных конференций.

Внедрение результатов исследования

Результаты исследования были внедрены в учебный процесс Института регенеративной медицины Научно-технологического парка биомедицины ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет) для преподавания образовательных курсов: «3D принтинг», «Биопечать», «Введение в регенеративную медицину». Результаты исследования были приняты к внедрению в промышленное производство коллагеновых биоматериалов ЗАО «Зеленая дубрава».

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 167 страницах машинописного текста, содержит 6 таблиц, 45 рисунков и состоит из следующих разделов: введение, четыре стандартные главы, заключение, выводы, практические рекомендации, список использованных сокращений и список литературы (260 источников: 3 отечественных и 257 иностранных).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Общий дизайн исследований. Диссертационная работа представляет собой экспериментальное исследование, состоящее из трех последовательных этапов (Рисунок 1). **На первом этапе** из сухожилий крупного рогатого скота получали фибриллярную суспензию коллагена, из которой при помощи метода ЭФО-ППБ производили коллагеновые матрицы. Коллагеновые матрицы испытывали как в исходном виде (химически несшитые), так и в химически сшитом виде. Были проанализированы структурные и физико-химические свойства

матриц, биосовместимость *in vitro* и *in vivo*. Для дальнейших экспериментов были отобраны несшитые коллагеновые матрицы. **На втором этапе** из несшитых ЭФО-ППБ матриц методом модификации получали Янус-матрицы и характеризовали их структурные и механические свойства. Янус-матрицы имплантировали на модели аугментационной уретропластики кроликам породы Советская шиншилла. **На третьем этапе** на основе Янус-матриц создавали модельный тканеинженерный конструкт уретры при помощи разработанного авторами метода LIFT-биопечати.



Рисунок 1 – Общий дизайн диссертационного исследования

Производство коллагеновых матриц. Коллаген в виде фибриллярной суспензии выделяли из сухожилий крупного рогатого скота методом механического диспергирования и экстракции в 0,5 М уксусной кислоте. ЭФО-ППБ выделенной суспензии коллагена с концентрацией 5 мг/мл проводили в электрохимической ячейке, разделенной на две части полупроницаемым барьером из целлюлозы Рисунок 2.

Процесс ЭФО-ППБ проводили с напряжением 60 В в течение 1, 2 или 3 циклов по 20 мин каждый и получали 1,2 и 3-слойные матрицы, соответственно. Контрольные матрицы получали методом воздушной сушки коллагена с концентрацией 8 мг/мл. Если не указано иное, для экспериментов использовали образцы, полученные после 3 циклов ЭФО-ППБ. Сшивку матриц производили 0.625% раствором генипина в течение 12 часов при 37 °С. Для получения Янус-структуры несшитую ЭФО-ППБ коллагеновую матрицу перфорировали с одной стороны при помощи косметического мезороллера, а затем ее лиофилизировали в течение 24 часов при -40 °С.

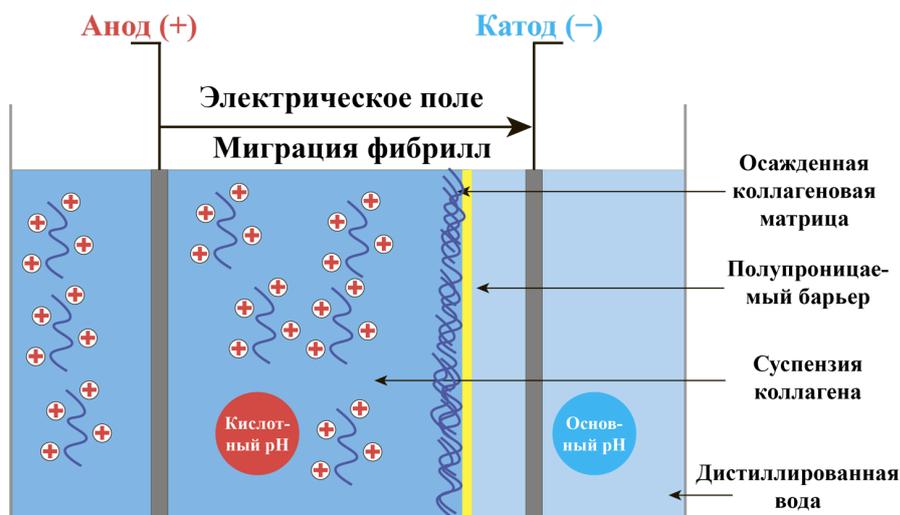


Рисунок 2 – Схема получения ЭФО-ППБ коллагеновых матриц. При кислотном pH положительно заряженные фибриллы коллагена мигрируют вдоль направления электрического поля к отрицательно заряженному катоду с основным pH. Поскольку полупроницаемый барьер непроницаем для фибрилл коллагена, движимые электрическим полем фибриллы плотно вдавливаются в его поверхность и оседают в коллагеновую матрицу

Клетки для экспериментов *in vitro*. Использовали первичную культуру человеческих МСК [Свистунов et al., 2020] и линию клеток фибробластов мыши 3Т3. МСК культивировали в модифицированной среде Дульбекко (DMEM)/F12, дополненной 10% фетальной телячьей сывороткой, 5 мг/мл L-глутамином, 1:100 инсулин-трансферрин-селенитом натрия, 20 нг/мл основным фактором роста фибробластов и 50 мг/мл гентамицином; фибробласты 3Т3 культивировали в среде DMEM/F12, дополненной 10% фетальной телячьей сывороткой и 50 мг/мл гентамицином.

Эксперименты на животных. Все эксперименты на животных были одобрены Локальным этическим комитетом Сеченовского Университета (протокол заседания № 07-23 от 27.04.2023). Подкожную имплантацию несшитых и сшитых ЭФО-ППБ коллагеновых матриц проводили самцам крыс Wistar (n = 20) в подкожные карманы глубиной 2 см. В установленные временные точки эксперимента - 3, 7, 14 и 21 послеоперационный день (ПОД) - животных (n=5)

подвергали эвтаназии в камере с углекислым газом. Имплантированные образцы извлекали из животных и процессировали для последующих анализов.

Для аугментационной уретропластики использовали кроликов породы «Советская шиншилла» (n=18). Кроликам производили иссечение участка уретры 2-2,5 см, коллагеновую Янус-матрицу фиксировали к белочной оболочке пещеристых тел, и сформированный дефект уретры замещали образцом Янус-матрицы. Неперфорированная сторона Янус-матрицы располагалась внутрь просвета уретры, перфорированная сторона располагалась со стороны губчатого тела. В контрольной группе иссеченный дефект уретры напрямую пришивали к белочной оболочке пещеристых тел. В контрольные точки эксперимента (15, 45, 90 и 180 ПОД) выводили по 3 кролика из каждой группы, резецировали уретру животного с прилежащими тканями и отправляли на гистологический и морфометрический анализ. В контрольной группе эксперимент завершили на 45-й день после операции по этическим соображениям.

LIFT-биопечать. LIFT клеточных сфероидов проводили в двух вариантах распределения энергии лазерного пятна (Рисунок 3). Первый вариант, режим «Гаусс», формировали экспериментальной установкой стандартной конструкции [Yusupov et al., 2020] (НТО "ИРЭ-Полюс", Россия) с $\lambda=1064$ нм. Во втором варианте лазерное пятно с негауссовым распределением энергии (режим «двойное кольцо») формировали за счет оптического элемента «Пи-шейпер» (AdlOptica Optical Systems GmbH, Германия), установленного в аналогичную экспериментальную установку (ООО "Лазер-компакт Плюс", Россия).

Биопечать проводили в стерильной чашке Петри, позиционирование находящихся внутри нее донорной подложки и коллекторной подложки осуществляли моторизованными подвижками. Донорная подложка состояла из предметного стекла, титанового энергопоглощающего покрытия и биочернил. Коллекторная подложка состояла из предметного стекла с гидрогелем или коллагеновой Янус-матрицы. При сравнении режимов печати (Гаусс, двойное кольцо) на основе выживаемости клеток сфероида печатали на гидрогелевую основу. Для биопечати сфероидов на Янус-матрицу для создания тканеинженерного конструкта уретры использовали режим двойного кольца. Контрольная группа состояла из сфероидов, оставшихся на донорной подложке после биопечати и пипетированных в культуральные планшеты. После LIFT-биопечати для сравнения режимов лазера и создания модельного ТИК сфероида культивировали в течение 3 дней.

Для приготовления биочернил сфероида смешивали с раствором 2 мг/мл гиалуроновой кислоты (Contipro, Чехия) в концентрации 1600 сфероидов/мл. Сфероида получали на основе МСК (2000 клеток на сфероид) [Kosheleva et al., 2022] при помощи агарозных неадгезивных планшетов, созданных с помощью трехмерных форм Petri Dish (Microtissues, США). Для формирования гидрогелевого слоя коллекторной подложки 25 мг/мл фибриноген (Sigma-Aldrich,

Германия) конъюгировали с PEG-NHS (Sigma-Aldrich, Германия) в молярном соотношении 5:1, и в смесь добавляли 5,6 мг/мл гиалуроновой кислоты. После LIFT-биопечати гидрогель коллекторной подложки желефицировали путем распыления 33 МЕ/мл тромбина (Sigma-Aldrich, Германия).

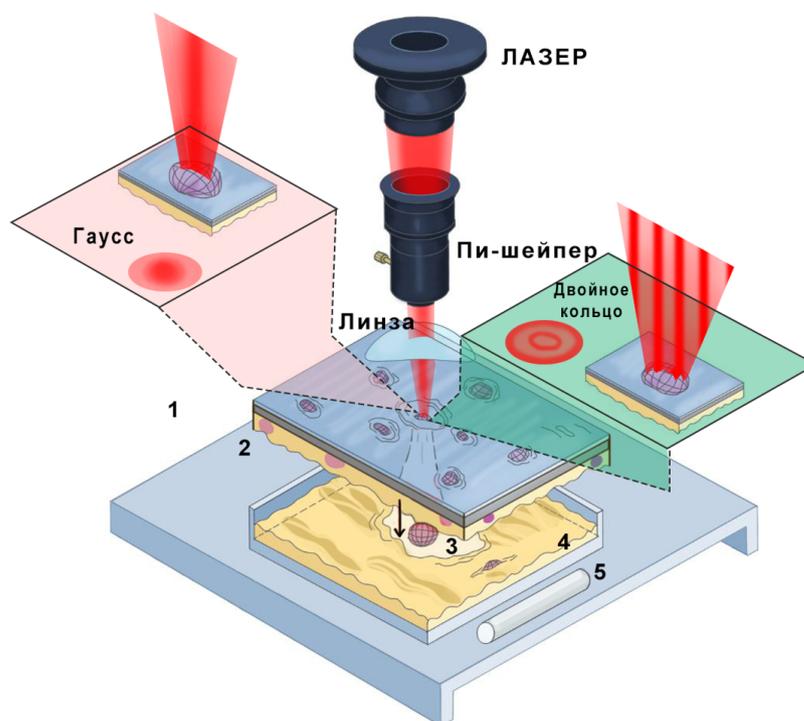


Рисунок 3 – Перенос клеточных сфероидов методом LIFT. 1 - пространство чашки Петри, 2 - донорная подложка, 3 - формирующаяся струя со сфероидом, 4 - коллекторная подложка (гидрогель или коллагеновая матрица), 5 - влажный тампон

Анализ коллагеновой суспензии и матриц. Суспензию коллагена исследовали при помощи: фазово-контрастной микроскопии Leica DM4000 B (Leica Microsystems, Швейцария); атомно-силовой микроскопии (АСМ) Bioscope Resolve (Bruker, США). Длину и ширину коллагеновых фибрилл по полученным снимкам рассчитывали с использованием программного обеспечения FIJI ImageJ (НИН, США) [n измерений = 180 в каждом случае]. Электрофоретическую подвижность фибрилл измеряли системой Zetasizer (Zetatrac, Microtrac Inc., США). Гель-электрофорез проводили при помощи PowerPac™ (Bio-Rad, США). Визуализацию микроструктуры матриц проводили на сканирующем электронном микроскопе (СЭМ) EVO LS10 [Zeiss, Германия]. Механические свойства матриц (n = 5 в каждой группе) испытывали во влажных условиях при помощи Mach-1 v500csst (Biomomentum Inc., Канада).

Анализ биосовместимости матриц *in vitro*. Для оценки непрямой цитотоксичности матриц (n = 5 в каждой группе) использовали экстракционный тест, адаптированный из ISO 10993 [Shprichka et al., 2017]. Метаболическую активность клеток анализировали с помощью теста

с резазурином (AlamarBlue™; Invitrogen, США). Количество ДНК анализировали с помощью набора PicoGreen™ (Invitrogen, США). Интенсивность флуоресценции измеряли с помощью спектрофлуориметра Victor Nivo (PerkinElmer, США).

Для оценки контактной цитотоксичности матриц ($n = 5$ в каждой группе) использовали линию клеток 3T3 и МСК из пуповины. На 7 день культивации клеток проводили тест Живой/Мертвый (кальцеин, пропидий йодид, Hoechst 33258, Thermo Scientific, США), и образцы анализировали конфокальным микроскопом LSM 880 (Zeiss, Германия). Метаболическую активность и количество их ДНК определяли тестами с AlamarBlue™ и PicoGreen™. Морфологию клеток на поверхности коллагеновых матриц изучали методом СЭМ на приборе EVO LS10 (Carl Zeiss, Германия).

Анализ имплантационного материала. После гистологической проводки срезы образцов ткани толщиной 4 мкм окрашивали гематоксилином и эозином (Г&Э), пикросириусом красным (ПСК) и по Маллори. Образцы исследовали в режиме световой, поляризационной и фазовоконтрастной микроскопии LEICA DM4000 B (Leica Microsystems, Германия). Для иммуногистохимического анализа образцы инкубировали с первичными антителами против альфа-актина гладких мышц (α -SMA) [A2547, Merck, США, 1:400] и вторичными, конъюгированными с пероксидазой хрена (G-21040, Invitrogen, США, 1: 1000).

В образцах подкожной имплантации расстояние резорбции матриц рассчитывали, как разницу средней толщины матрицы в сравнении с ПОД 3. Количество миофибробластов и клеток инородных тел подсчитывали в 10 или более полях зрения периимплантных тканей, и выражали в клетках/мм². Доля соединительнотканых прослоек оценивалась, как процентное отношение их общей толщины к общей толщине импланта. В образцах уретры морфологические признаки регенерации и резорбции оценивали по 5-балльной шкале (где 0 – признак отсутствует, 1-минимальная интенсивность признака, 2 – средняя интенсивность признака, 3 – выраженное проявление признака, 4 - максимальная интенсивность).

Анализ в рамках LIFT-биопечати. После биопечати сфероидов проводили тест Живой/Мертвый, количественную оценку которого выполняли программой ImageJ (NIH, США). Долю живых/мертвых клеток в сфероидах ($n=15$) измеряли с помощью разделения цветовых каналов, и значения флуоресценции пересчитывали в проценты.

Статистическая обработка. Статистический анализ проводили с помощью программного обеспечения GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., США). Для проверки нормальности распределения данных использовали тест Шапиро-Уилка. В случае нормального распределения для сравнения групп использовали критерий Стьюдента или двусторонний дисперсионный анализ (двусторонний ANOVA) с использованием теста Тьюки; результаты были представлены как среднее \pm стандартное отклонение. В случае дискретных данных сравнение проводили с

помощью критериев Манна-Уитни или Краскела-Уоллиса с использованием теста Данна; результаты были представлены в виде медианных значений и интерквартильного размаха. Различия считали значимыми при $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Получение ЭФО-ППБ коллагеновых матриц. Экстрагированный коллаген представлял собой суспензию из фибрилл с D-периодичностью. Длина фибрилл, исходя из снимков АСМ и фазово-контрастной микроскопии, равнялась 158 [26; 470] мкм, диаметр - 292 [117; 667] нм. Электрофоретический анализ подтвердил соответствие экстрагированного коллагена типу I. Изоэлектрическая точка была равна ~ 5.6 . Фибриллярный коллаген из сухожилий был выбран по причине чистоты, стабильности во время ЭФО, большей прочности и нативности [Ramesh Kumar, Merschrod S., Poduska, 2009; Gallo et al., 2020].

После ЭФО-ППБ образовавшаяся на ППБ коллагеновая матрица представляла собой плотную и полностью бездефектную структуру. В сравнении с ними матрицы после ЭФО без ППБ и высушенные на воздухе имели дефектную структуру из-за включений пузырьков. На снимках СЭМ структура ЭФО-ППБ матриц была плотноупакованной и однородной, а на поверхностных снимках прослеживалась их фибриллярность. При сравнении модулей Юнга в группе несшитых матриц ЭФО-ППБ мы наблюдали различия в зависимости от числа циклов ЭФО-ППБ (Таблица 1).

Таблица 1 – Механические свойства коллагеновых матриц

Матрица	Индекс сшивки, %	Температура сваривания, °C	Набухаемость, %	Толщина, мкм
Несшитая ЭФО1/2/3	0	49.9 ± 0.6	409 ± 26	$53 \pm 8/110 \pm 12/140 \pm 5$
Несшитая Сушка	0	49.3 ± 0.8	418 ± 61	65 ± 12
Сшитая ЭФО1/2/3	13.7 ± 0.4	68.5 ± 0.7	102 ± 11	$35 \pm 5/75 \pm 8/94 \pm 8$
Сшитая Сушка	13.6 ± 0.9	68.4 ± 0.6	102 ± 13	42 ± 5

У несшитых матриц после 1, 2 и 3 циклов ЭФО-ППБ нарастал модуль Юнга и предел прочности. У высушенных на воздухе матриц эти показатели соответствовали таковым для матриц 1 цикла. При сравнении деформаций при разрыве все типы матриц ЭФО-ППБ показали статистически значимые более высокие значения по сравнению с матрицами, полученными

сушкой, что свидетельствует об ином характере укладки коллагена и межфибриллярных взаимодействий [Hadi, Barocas, 2013].

Сшивка матриц генипином приводила к значительному увеличению модуля Юнга и одновременному уменьшению его различий как внутри группы ЭФО-ППБ, так и в сравнении с высушенными на воздухе образцами. Однако для сшитых матриц ЭФО-ППБ значения деформации при разрыве и предела прочности были значительно выше, чем для полученных сушкой матриц.

***In vitro* испытания ЭФО-ППБ матриц.** Окраска Живой/Мертвый показала большое количество жизнеспособных клеток на сшитых и несшитых ЭФО-ППБ матрицах после 7 дней культивирования. Количественный анализ показал, что нормализованная метаболическая активность МСК была больше на несшитых образцах, а 3Т3 - на сшитых. Согласно экстракционному тесту с Аламаровым синими и PicoGreen® сшивка генипином также не повлияла на токсические свойства матриц (значения выше 70% от контроля) [Zurina et al., 2018]. Однако сшитые матрицы, исходя из снимков СЭМ, способствовали меньшему распластыванию и прикреплению к ним клеток за счет заблокированных сшивками доменов связывания [Enea et al., 2011].

***In vivo* испытания ЭФО-ППБ матриц.** Начиная с 3-го дня после операции (ПОД 3), проводилось гистологическое исследование эксплантированных образцов при помощи окрасок Г&Э, ПСК и α -SMA, и морфометрические параметры несшитых и сшитых матриц были количественно измерены (Рисунок 4). На ПОД 21 день сшитые матрицы резорбировались в ~ 3.5 раза медленнее несшитых (Рисунок 4А). Из-за медленных темпов деградации сшитые матрицы вызвали реакцию на инородное тело [Delgado et al., 2015]. Периимплантажная ткань сшитых матриц в сравнении с несшитыми содержала большее количество миофибробластов (55 [44;95]/мм² против 0 [0;5]/мм²) и клеток инородных тел (350 [275;425]/мм² против 60 [28;113]/мм², соответственно) [Рисунок 4Б, В]. Процент врастания соединительной был выше у несшитых матриц в сравнении со сшитыми (13 \pm 7% против 0%) [Рисунок 4Г].

Исходя из полученных нами данных, для получения Янус-матриц и проведения экспериментов по уретропластике за основу было решено выбрать химически несшитые ЭФО-ППБ матрицы, полученные в результате 3 циклов осаждения: они обладают наибольшей прочностью, лучшей адгезивностью для клеток, сроки их биodeградации попадают в оптимальное окно [Atala et al., 2017], а риск профибротических осложнений и стриктурирования после имплантации в уретру минимален [Delgado et al., 2015].

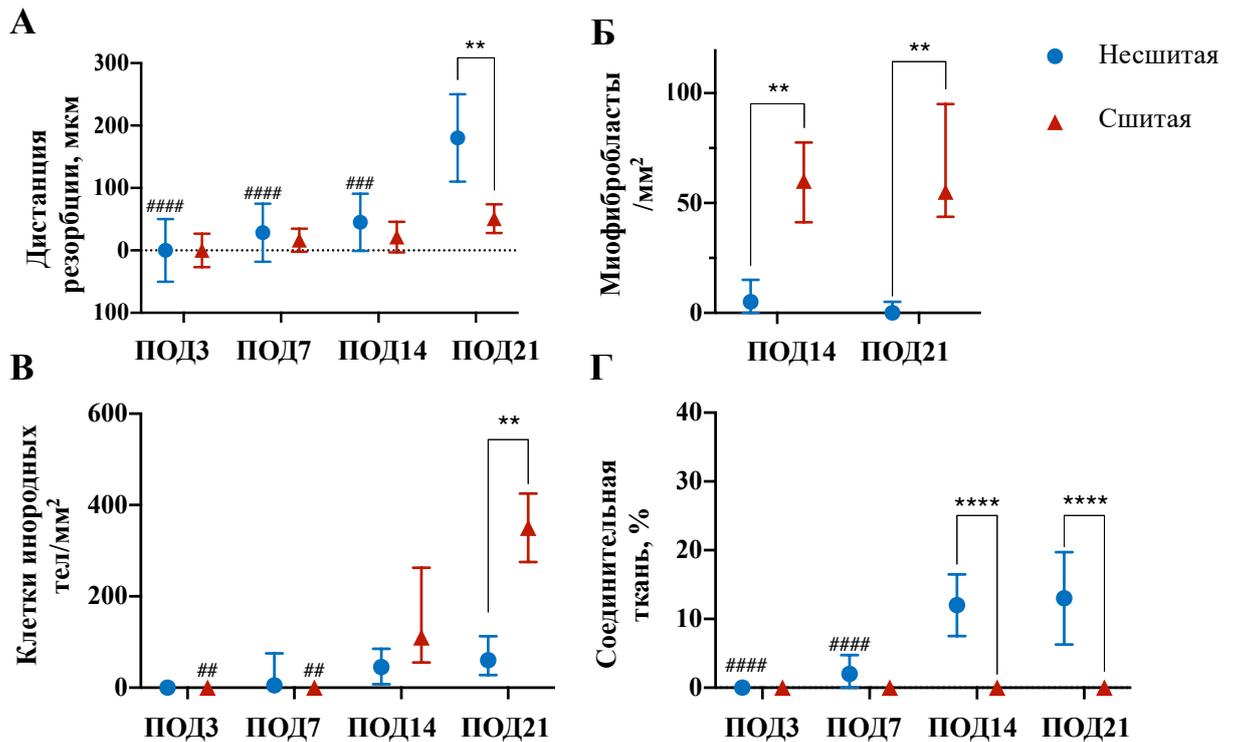


Рисунок 4 – Оценка реакции *in vivo* на несшитые и сшитые матрицы ЭФО-ППБ. А) Дистанция резорбции матриц в абсолютных значениях от толщины на ПОД 3. Б) Количество миофибробластов в 1 мм² вокруг матриц. В) Количество клеток инородных тел в 1 мм² вокруг матриц. Г) Процент врастания соединительной ткани в матрицу. Данные в А,Г представлены как среднее \pm стандартное отклонение, в Б,В – как медиана и интерквартильный размах. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$ для сравнения между группами, те же значения P для # при сравнении внутри групп к ПОД 21

Структурно-механические свойства Янус-матриц. Поверхность исходной (несшитой) ЭФО-ППБ матрицы была гладкой с обеих сторон, а ее срез был плотным и непористым (Рисунок 5А, Б). После проведенной модификации (лиофилизация, перфорация) из этих матриц мы получили Янус-матрицы (Рисунок 5В, Г). Янус-матрица, по определению [Lei et al., 2019], обладает двойственностью (в честь бога Януса). В нашем случае, одна поверхность Янус-матриц была гладкая и неперфорированная, другая - изрешетена перфорациями. Кроме того, срез Янус-матриц приобретал пористость.

Созданные Янус-матрицы были подобны по механическим свойствам нативной уретре (Таблица 2). Янус-матрицы имели модуль Юнга (2.2 ± 0.5 МПа) и деформацию при разрыве (38 ± 8 %), что меньше, чем у исходных ЭФО-ППБ матриц (15.1 ± 1.8 МПа и 60 ± 12 %, соответственно). Примечательно, что по части модуля упругости Янус-матрицы были механически подобны нативной уретре [Feng et al., 2010], однако деформация при разрыве у нативной уретры оказалась гораздо выше.

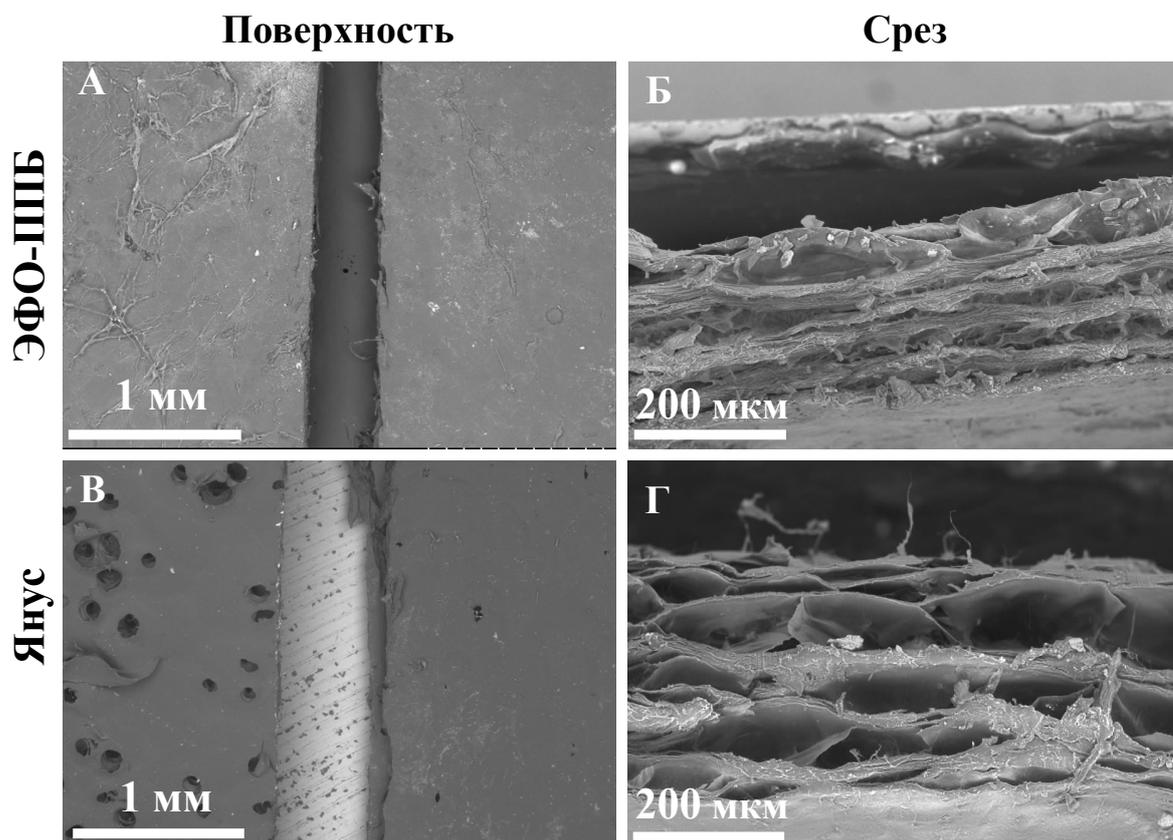


Рисунок 5 – Изображения структуры коллагеновых матриц, полученные СЭМ. Исходные ЭФО-ППБ матрицы (А,Б) в сравнении с Янус-матрицами (В,Г). На изображениях А,В слева и справа показаны разные поверхности матриц

Таблица 2 – Механические свойства коллагеновых матриц и уретры

Группа	Модуль Юнга, МПа	Деформация при разрыве, %
Исходная ЭФО-ППБ	15.1 ± 1.8	60 ± 12
Янус-матрица ЭФО-ППБ	2.2 ± 0.5	38 ± 8
Нативная уретра [Feng et al., 2010]	2 ± 0.7	173 ± 51

Аугментационная уретропластика. В ходе проведения операций по уретропластике все Янус-матрицы были удобными для манипуляций хирургом и не повреждались при наложении швов. В послеоперационном периоде в группе имплантации Янус-матрицы ни на один из сроков у животных не было отмечено признаков стриктурирования по данным ретроградной цистоуретрографии (Таблица 3). В то же время, в контрольной группе уже на 45 ПОД у 2 из 3 кроликов было затруднено мочеиспускание, а по данным ретроградной цистоуретрографии наблюдались признаки стриктурирования уретры, и эксперимент был завершён по этическим причинам.

Таблица 3 – Развитие стриктур уретры в зависимости от послеоперационного дня

Группа	15 дней	45 дней	90 дней	180 дней
Янус-матрица	0 (n=3)	0 (n=3)	0 (n=3)	0 (n=3)
Контроль	0 (n=3)	2 (n=3)	Завершен	Завершен

Полуколичественная балльная оценка по данным гистологического анализа на основе окрасок Г&Э, ПСК, Маллори и α -SMA для процессов регенерации в экспериментальной (Янус-матрица) и контрольной группах приведена на Рисунке 6. Восстановление сосочков слизистой в зоне имплантации для обеих групп началось с ПОД 45, и на ПОД 180 в группе Янус-матрицы их структура была близка к нативной. Наиболее существенно группы отличались по показателю фибротических изменений: в контрольной группе фиброз слизистой достигал субмаксимальных значений на ПОД 15, а к ПОД 45 - перешел в фазу ярко выраженной фиброзно-рубцовой трансформации, что клинически выражалось как стриктурирование просвета уретры. В то же время в группе Янус-матрицы признаков формирования фибротических процессов не наблюдалось. Резорбция матрицы в экспериментальной группе происходила наиболее активно в первые 2 недели после операции, и к ПОД 90 матрица полностью была резорбирована.

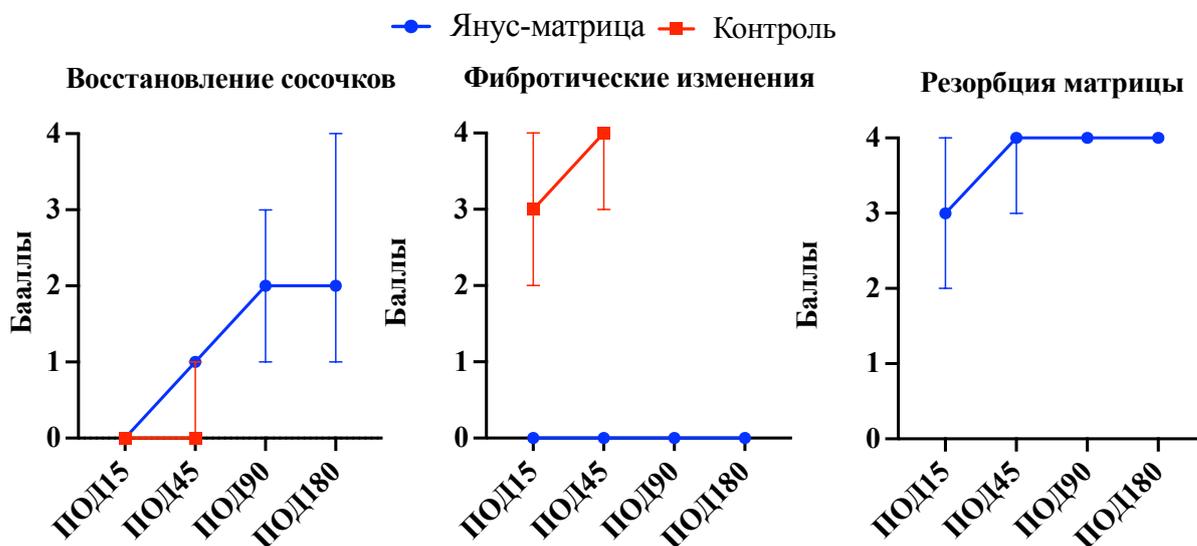


Рисунок 6 – Динамические изменения признаков регенерации и воспаления в участках оперативного вмешательства в экспериментальной (Янус-матрица) и контрольной группах. Результаты представлены в виде медианных значений и интерквартильных размахов. * $P < 0,05$

Таким образом, дизайн созданной нами Янус-матрицы позволил добиться почти полной регенерации слизистой уретры. Ее сплошная сторона эффективно играла барьерную роль и не допустила затеков мочи в периуретральные ткани по данным ретроградной цистоуретрографии, с чем многие авторы связывают вторичное стриктурирование [Culenova et al., 2019]. Улучшению

результатов приживаемости и интеграции матрицы с окружающими тканями могла служить и схожесть ее механических параметров с нативной уретрой (Таблица 2). В ряде исследований было показано, что такой природоподобный дизайн импланта является важным фактором, предотвращающим развитие негативных реакций на имплант и влияющим на качество регенерации [Haag, Dalton, Bloemen, 2022].

Схожесть механических свойств Янус-матрицы с уретрой обуславливалась, во-первых, пористостью матрицы [Cunnane et al., 2021], а также фибриллярностью коллагенового сырья – за счет неразрушенной нативной надмолекулярной структуры, подобной таковой в естественном внеклеточном матриксе [Elliott et al., 2007]. Кроме того, фибриллярность обуславливала и механическую прочность создаваемой матрицы [Li et al., 2009; Zhang et al., 2009].

Ни одна из имплантированных Янус-матриц не была подвержена образованию дефектов или повреждений при манипулировании хирургом и наложении швов. Механическая прочность обуславливалась и методом плотной укладки матрицы при помощи ЭФО-ППБ. ЭФО позволяет достигнуть повышенной плотности укладки коллагена в сравнении с другими методами его реконструкции и, как следствие, улучшенных механических свойств [Cheng et al., 2016; Antoshin et al., 2023].

Создание модельного тканеинженерного конструкта уретры. Несмотря на успешные испытания Янус-матриц в текущем исследовании, ряд исследователей сообщал о необходимости создания тканеинженерных конструктов (ТИК) уретры для более сложных видов уретропластики [Qi, Li, Tian, 2016]. В данной работе для целей создания ТИК мы использовали метод LIFT-биопечати с модификацией Пи-шейпером. Пи-шейпер позволяет изменять гауссово распределение энергии в лазерном пучке на негауссово (режим двойного кольца).

LIFT-биопечать с гауссовым распределением энергии может повреждать клетки из-за создаваемого механического напряжения [Catros et al., 2011] и температуры [Desrus et al., 2016], в то время как Пи-шейпер позволяет минимизировать эти эффекты за счет изменения геометрии лазерного пятна [Minaeva et al., 2023]. Действительно, в наших экспериментах было показано, что при биопечати сфероидов с гауссовым распределением энергии выживаемость клеток была ниже ($56.1 \pm 5.8\%$), чем в группе негауссова распределения энергии (режим двойного кольца) ($76.6 \pm 13\%$) и контроля ($81.1 \pm 13.7\%$).

Используя LIFT в режиме биопечати с максимальной выживаемостью (двойное кольцо), мы перенесли сфероиды из МСК на коллагеновую Янус-матрицу для создания модельного тканеинженерного конструкта уретры (Рисунок 7А, Б). Модельным тканеинженерный конструкт назван потому, что основой напечатанных сфероидов были не специфичные для уретры клетки [Liu et al., 2020], а мезенхимальные стромальные клетки. МСК были выбраны как наиболее универсальный и изученный модельный тип клеток, используемый для биопечати сфероидными

[Bikmulina et al., 2023], что позволило валидировать разработанный нами протокол LIFT-биопечати и сравнить с другими протоколами биопечати.

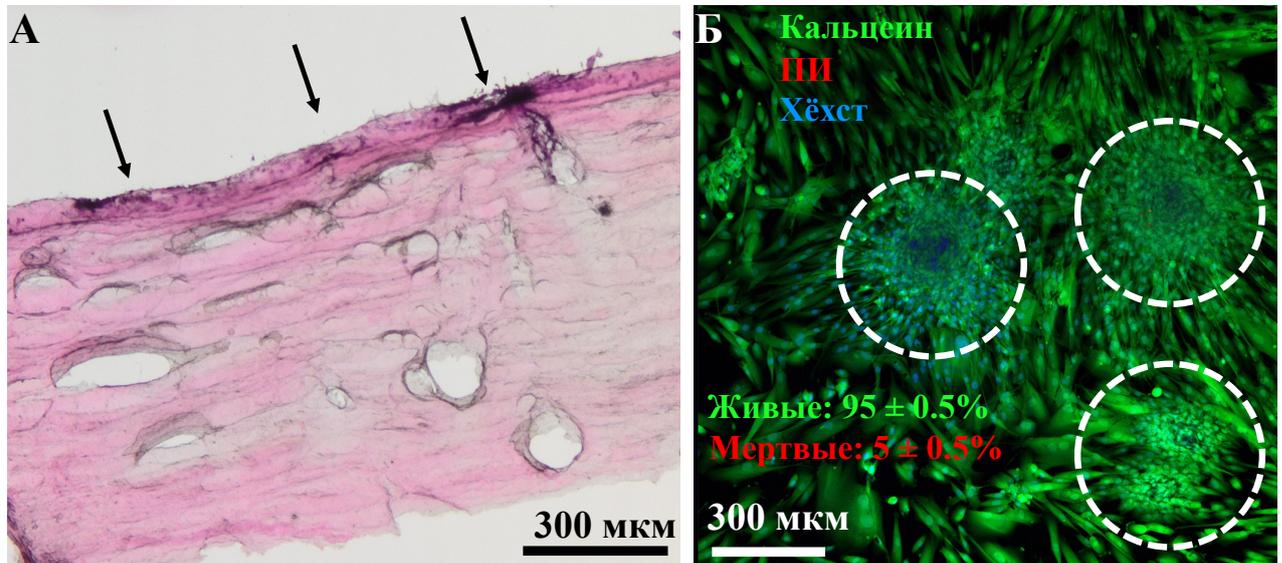


Рисунок 7 – Модельный тканеинженерный конструкт уретры. А- поперечный срез конструкта, окраска гематоксилин-эозин, светлопольная микроскопия. Стрелки указывают на клеточный слой на поверхности. Б – поверхность конструкта с клетками, окраска Живой/Мертвый, конфокальная микроскопия. Пунктиром обведены расплывающиеся сфероиды. Флуоресцентное окрашивание живых клеток (кальцеином, свечение зеленым), мертвых клеток (пропидий йодидом, свечение красным), ядер (хехст, свечение синим). Данные представлены в виде среднего \pm стандартное отклонение

Почти все напечатанные МСК были живыми ($95 \pm 0.5\%$), в то время как мертвых клеток было минимальное количество ($5 \pm 0.5\%$) [Рисунок 7Б]. Такая высокая выживаемость клеток является достаточной для адекватного формирования тканеинженерного конструкта [Mohammadrezaei et al., 2023] и может объясняться положительным влиянием коллагеновой Янус-подложки, способной представлять клеткам необходимые биологические сигналы для их адгезии и пролиферации [Pozzi et al., 1998].

Ограничения исследования и дальнейшая работа. В данном исследовании мы применили самую простую модель уретропластики – без предварительного повреждения тканей уретры, и полученные результаты необходимо будет также валидировать в будущих экспериментах на более продвинутых и сложных моделях уретропластики: с развившемся фибротическим компонентом в зоне имплантации, а также с применением тубуляризованных имплантов. При создании модельного ТИК мы использовали МСК как наиболее удобный вид клеток, и разработанный нами протокол биопечати с помощью LIFT является первым шагом к созданию полноценного ТИК уретры. В дальнейшем разработанный нами протокол переноса сфероидов из МСК должен быть валидирован и на другие типы сфероидов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные нами результаты впервые практически демонстрируют потенциал ЭФО-ППБ для создания коллагеновых матриц, которые могут применяться для нужд тканевой инженерии. Разработанная технология ЭФО-ППБ позволила получать матрицы в полностью бездефектном виде при относительно высоком напряжении (60 В) и с достаточной механической прочностью.

В результате биологических испытаний *in vitro* была показана полная биосовместимость химически несшитых и сшитых ЭФО-ППБ матриц в отношении МСК и фибробластов 3Т3. При подкожной имплантации была показана более медленная деградация сшитых матриц в совокупности с профибротическим и гигантоклеточным ответом. Поэтому для дальнейших экспериментов с уретропластикой было решено выбрать химически несшитые ЭФО-ППБ матрицы с минимальным риском профибротических осложнений, а также оптимальным сроком биодеградации.

На основе выбранных несшитых ЭФО-ППБ коллагеновых матриц при помощи лиофилизации и механической перфорации для экспериментов с уретропластикой были созданы Янус-матрицы. Особенностью Янус-матриц была двойственность их структуры: одна их сторона была неперфорированной и сплошной, вторая сторона была перфорированной. По неперфорированной стороне, обращенной после имплантации внутрь просвета уретры, нарастал эпителий, а также она обеспечивала барьерную функцию и предотвращала проникновение мочи в окружающие ткани. Внутри перфорированной стороны, обращенной ко дну дефекта уретры (белочной оболочке пещеристых тел), быстрее прорастала соединительная ткань и сосуды, необходимые для неопителлизации и биоинтеграции Янус-матрицы.

Кроме того, Янус-матрица была схожа по механическим свойствам с нативной уретрой по механическим свойствам (их модуль Юнга был практически идентичным), что также является важным фактором для успешного приживления матриц и быстрого заживления тканевых дефектов. К 180 дню после уретропластики Янус-матрицей наблюдалась полная эпителизация дефекта с почти полным восстановлением нативной структуры слизистой. Матрица полностью биодеградировала к 45-90 суткам. Признаки фиброзно-рубцовых изменений в стенке слизистой уретры отсутствовали. В контрольной группе к 45 суткам у животных развилась явная стриктура уретры, и эксперимент на этой точке был завершен по этическим соображениям. Регенерировавшая слизистая была представлена фиброзно-рубцовой тканью с умеренной лимфомакрофагальной инфильтрацией и фиброзированными сосудами.

Для возможности улучшения прогноза применения Янус-матрицы в более сложных видах уретропластики (например, заместительной), мы разработали способ ее заселения 3D-клеточными сфероидными на основе МСК, создав тем самым модельный тканеинженерный конструктор уретры. Нами впервые была доказана принципиальная применимость метода лазерно-

индуцированного прямого переноса (LIFT) для биопечати 3D-клеточных сфероидов с высокой выживаемостью. Это стало возможным за счет применения специального устройства – Писейпера, способного менять гауссово распределение энергии в лазерном пучке (повреждающее сфероиды) на негауссово (в форме двойного кольца, минимизирующее негативное воздействие на сфероид). В дальнейших работах LIFT-биопечать будет применена для прецизионного переноса сфероидов на основе клеток, специфичных для уретры (эпителиальной и гладкомышечной природы), с высокой плотностью и упорядоченностью, что позволит создать полноценный и функциональный тканеинженерный конструкт уретры.

ВЫВОДЫ

1. Разработана оригинальная технология электрофоретического осаждения с полупроницаемым барьером, позволяющая получать прочные коллагеновые матрицы с бездефектной и плотноупакованной структурой. За счет химической сшивки возможно регулировать механические свойства матриц в широком диапазоне: модуль Юнга (7–64 МПа), деформацию при разрыве (24–60%) и предел прочности (2–10 МПа).

2. Установлено, что несшитые и сшитые коллагеновые матрицы не оказывают контактного цитотоксического действия на клетки (МСК и 3Т3). Экстракты обоих типов матриц также оказались нетоксичными для клеток (выживаемость >70%).

3. Показано, что на 21-й день после подкожной имплантации крысам сшитые матрицы резорбируются в 3,5 раза медленнее несшитых, а также вызывают гигантоклеточную реакцию и активацию миофибробластов. Таким образом, для Янус-модификации были выбраны несшитые коллагеновые матрицы.

4. Разработан способ получения матриц с Янус-структурой из несшитых коллагеновых матриц при помощи механической перфорации и лиофилизации. Одна сторона таких Янус-матриц является сплошной и неперфорированной, другая - содержит перфорации; толщина Янус-матриц пористая.

5. Янус-матрицы были успешно испытаны на модели аугментационной уретропластики: к 180-му дню после имплантации слизистая в области дефекта почти полностью регенерировала, а стриктура не развилась ни у одного из кроликов. В контрольной группе эксперимент был остановлен на 45-й день по этическим причинам – 2 из 3 кроликов имели клинически выраженную стриктуру.

6. Разработана оригинальная технология биопечати клеточных сфероидов методом лазерно-индуцированного прямого переноса с применением оптического устройства – Писейпера. Данной технологией сфероиды из мезенхимальных стромальных клеток были

перенесены на коллагеновую Янус-матрицу с высокой выживаемостью ($95 \pm 0,5\%$), что позволило создать модельный тканеинженерный конструкт уретры.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Метод электрофоретического осаждения с полупроницаемым барьером позволяет получить прочные бездефектные коллагеновые матрицы, пригодные для хирургического применения. Созданные на их основе Янус-матрицы могут использоваться в качестве трансплантатов для аугментационной уретропластики.

2. Применение Пи-шейпера для изменения распределения энергии в лазерном пучке при LIFT-биопечати сфероидов позволяет существенно увеличить их выживаемость. LIFT-биопечать с использованием Пи-шейпера можно использовать для создания ТИК уретры на основе сфероидов и коллагеновых Янус-матриц.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Applying LIFT-technology for vasculature formation in tissue and organ engineering / **А.А. Antoshin**, M.D. Fedyakov, M.S. Sobolevskaya, S.N. Churbanov, N.V. Minaev, A.I. Shpichka, P.S. Timashev // 2018 International Conference Laser Optics (ICLO). Saint-Petersburg, 4-8 June 2018. – P. 475.

2. Установка для исследования лазерно-индуцированного переноса гелевых микрокапель с живыми клеточными и микробными объектами / Н.В. Минаев, В.И. Юсупов, Е.С. Чурбанова, С. Н. Чурбанов, В.И. Жигарьков, **А.А. Антошин** // **Приборы и техника эксперимента**. – 2019. – № 1. – С. 153-155.

3. LIFT-bioprinting, is it worth it? / **А.А. Antoshin.**, S.N. Churbanov, N.V. Minaev [et al.] // **Bioprinting**. – 2019. – Vol. 15. – E00052. [Scopus].

4. Laser-induced forward transfer hydrogel printing: a defined route for highly controlled process / V. Yusupov, S. Churbanov, E. Churbanova, K. Bardakova, **А. Antoshin**, S. Evlashin, P. Timashev, N. Minaev // **International journal of bioprinting**. – 2020. – Vol. 6. – Issue 3. – Article number: 271. [Scopus, PubMed].

5. Минаева, Е.Д. Исследование процесса лазерно-индуцированного прямого переноса агрегатов из живых клеточных культур – клеточных сфероидов / Е.Д. Минаева, **А.А. Антошин**, Н.В. Минаев // XI Международная конференция по фотонике и информационной оптике: Сборник научных трудов. Москва, 26-28 января 2022 г. – С. 114.

6. 3D or not 3D: a guide to assess cell viability in 3D cell systems / P. Bikmulina., N. Kosheleva, Y. Efremov, **А. Antoshin**, Z. Heydari, V. Kapustina, V. Royuk, V. Mikhaylov, V. Fomin, M. Vosough,

P. Timashev, Y. Rochev, A. Shpichka // **Soft Matter**. – 2022. – Vol. 18 – Issue 11. – P. 2222–2233. [Scopus].

7. Semipermeable barrier-assisted electrophoretic deposition of robust collagen membranes / **A. Antoshin**, O. Dubinin, L. Miao [et al.] // **Journal of Materials Science**. – 2023. – Vol. 58 – P. 9675–9697. [Scopus].

8. Laser Bioprinting with Cell Spheroids: Accurate and Gentle / E.D. Minaeva, **A.A. Antoshin**, N. V. Kosheleva [et al.] // **Micromachines**. – 2023. – Vol. 14. – Issue 6. – Article number: 1152. [Scopus, PubMed].

9. LIFT of cell spheroids: Proof of concept / **A. Antoshin**, E. Minaeva, P. Koteneva [et al.] // **Bioprinting**. – 2023. – Vol. 34. – E00297. [Scopus].

10. Применение фибриллярных коллагеновых матриц с Янус-структурой для аугментационной уретропластики/ **А.А. Антошин**, Б.П. Ершов, А.Н. Гилязова, С.Ю. Волошин, Е.В. Истранова, Я.И. Христидис, А.Л. Файзуллин, Д.В. Бутнару, П.С. Тимашев // *Современные тренды в биофотонике – 2023: сборник тезисов докладов*. Нижний Новгород, 3-5 июля 2023 г. – С. 60.

СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ЭФО - электрофоретическое осаждение

ЭФО-ППБ - электрофоретическое осаждение с полупроницаемым барьером

LIFT - laser-induced forward transfer (рус. - лазерно-индуцированный прямой перенос)

СЭМ - сканирующая электронная микроскопия

АСМ - атомно-силовая микроскопия

ДНК - дезоксирибонуклеиновая кислота

ТИК – тканеинженерный конструкт

МСК - мезенхимальные стромальные клетки

3Т3 - линия клеток фибробластов мыши

ИК – инфракрасный

США - Соединенные Штаты Америки

DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium

(рус. - модифицированная по способу

Дульбекко среда Игла)

НИН - National Institute of Health (рус. – Национальный институт здоровья)

ПОД - послеоперационный день

Г&Э – окраска гематоксилин-эозином

ПСК - пикросириус красный

α-SMA – альфа-актин гладких мышц

ANOVA - analysis of variance (рус. - дисперсионный анализ)